

聚乙二醇修饰靶向纳米制剂的研究进展

刘源^{1,2}, 周建平^{1,2*}, 王伟^{1,2**}(中国药科大学¹药剂学教研室;²天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 南京 210009)

摘要 由于聚乙二醇具有良好的亲水性和柔顺性,能够改善药物的药代动力学和药效学特性,将其修饰到靶向纳米制剂表面能够增加药物在体内的滞留时间和浓度,因此聚乙二醇修饰靶向纳米制剂已成为目前药剂学领域的研究热点。本文总结了靶向纳米制剂的聚乙二醇物理和化学修饰方法,将聚乙二醇-脂质衍生物物理插入纳米制剂,或将聚乙二醇与纳米制剂化学键合;并探讨了聚乙二醇参数(如聚乙二醇相对分子质量、修饰密度、空间构象)对靶向纳米制剂性质的影响,对更好地构建聚乙二醇修饰的靶向纳米制剂提供参考。

关键词 聚乙二醇修饰;靶向纳米制剂;物理插入;共价结合;参数优化

中图分类号 R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2017)03-0268-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170303

引用本文 刘源,周建平,王伟. 聚乙二醇修饰靶向纳米制剂的研究进展[J]. 中国药科大学学报,2017,48(3):268-275.

Cite this article as: LIU Yuan, ZHOU Jianping, WANG Wei. Advances in PEGylated targeted nano-preparation[J]. *J China Pharm Univ*, 2017, 48(3):268-275.

Advances in PEGylated targeted nano-preparation

LIU Yuan^{1,2}, ZHOU Jianping^{1,2*}, WANG Wei^{1,2**}¹Department of Pharmaceutics; ²State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Polyethylene glycol (PEG) with good hydrophilicity and flexibility can improve pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of the nano-preparation, so PEG modification in the surface of nano-preparation can increase the *in vivo* residence time and concentration of drugs. At present, the targeted nano-preparation with PEG modification has become a research hotspot in the field of pharmaceutics. In this paper, the physical and chemical methods of PEG modification in targeted nano-preparation was summarized, which includes physically inserting PEG-lipid derivatives in nanostructure of targeted nano-preparation or modifying PEG with targeted nano-preparation. In addition, the influence of PEG parameters (molecular mass, modified density and spatial conformation) on properties of targeted nano-preparation was also discussed, which is important to preferably structure PEGylated targeted nano-preparation.

Key words polyethylene glycol modification; targeted nano-preparation; physical insertion; covalent binding; parameter optimization

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81102398, No. 81273469); the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2011624); the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JKVD2013011); the National Found for Fostering Talents of Basic Science (No. J1030830); and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD)

收稿日期 2016-11-09 ***通信作者** *Tel:025-83271102 E-mail:zhoujp60@163.com

**Tel:025-83271102 E-mail:wangcpu@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81102398, No. 81273469);江苏省自然科学基金资助项目(No. BK2011624);中央高校基本科研业务费专项基金资助项目(No. JKVD2013011);国家基础科学人才培养基金资助项目(No. J1030830);江苏高校优势学科建设工程资助项目

开发一种能选择性到达作用部位而不影响正常细胞的药物,即使药物具有靶向性,这一想法最初由诺贝尔奖获得者德国科学家 Paul Ehrlich 提出^[1]。近几十年,在药物制剂领域,纳米制剂为开发具有特定靶向性的药物做出了极大的贡献。纳米制剂具有以下特点:①增加疏水性药物的溶解度;②延长药物在体内的滞留时间;③体内缓慢、控制释放药物;④将药物主动或被动靶向至药物作用部位,减少对正常组织的不良反应。纳米制剂包括脂质体、胶束、微球、纳米粒、纳米囊等,其可通过增强的渗透和滞留效应 (enhanced permeability and retention effect, EPR 效应) 被动靶向至药物作用部位,也可在其表面修饰配体、单抗等主动靶向到药物作用部位^[2]。但由于纳米制剂在体内不稳定,容易被网状内皮系统 (reticuloendothelial system, RES) 吞噬,导致其在体内的循环时间缩短,药物释放减少,从而降低临床效果^[3]。

研究者们针对纳米制剂存在的问题提出了解决方案,即采用亲水性高分子材料修饰纳米制剂,常用的是聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG)。PEG 修饰技术的研究始于 20 世纪 70 年代,主要集中在 PEG 蛋白质化学修饰方面,这不仅可以增加该蛋白质的水溶性,还能减少肾脏对其的清除,保护其免遭体内环境破坏^[4]。由于 PEG 在纳米制剂表面形成高分子隔离层,阻断血浆蛋白对纳米制剂的吸附,减少 RES 的吞噬,延长药物在体内的循环时间。

经过几十年的发展,PEG 修饰技术已经广泛应用到不同的医药领域。将 PEG 修饰到靶向纳米制剂可通过不同方式实现,如将 PEG-脂质衍生物 (如 PEG-二硬脂酰磷脂乙醇胺、PEG-胆固醇、PEG-脂肪酸等) 物理插入至纳米制剂;将官能团修饰的 PEG 化学连接至纳米制剂^[5]。为了构建最优的 PEG 修饰的靶向纳米制剂,在探索 PEG 修饰方法的同时,人们开始关注 PEG 参数 (相对分子质量、修饰密度、空间构象等) 对靶向纳米制剂性质的影响。

1 PEG-物理修饰靶向纳米制剂

1990 年,Blume 等^[6]和 Klivanov 等^[7]使用 PEG-脂质衍生物成功增加了其修饰脂质体的体内外稳定性。该项研究结果让研究者们更多地去采用价格相对较低、种类多样、合成简单、安全性高、生物相容性良好及修饰效果较佳的 PEG-脂质

(PEG-lipid) 物理插入纳米制剂,这样空间位阻效应阻止了纳米颗粒之间的聚集,减弱血浆蛋白对其识别与吸附作用,延长其在血液中的滞留时间,增加纳米制剂的物理、化学及生物学稳定性。

1.1 PEG-二硬脂酰磷脂乙醇胺修饰靶向纳米制剂

脂质体因表面修饰 PEG 而具有空间稳定性,表面吸附水层,减少与调理素的相互作用和 RES 的吞噬作用。实验研究中广泛采用聚乙二醇-二硬脂酰磷脂乙醇胺 (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[methoxy (polyethylene glycol)], PEG-DSPE) 制备脂质体。本课题组 Zhang 等^[8]采用 DSPE-PEG-茴香酰胺修饰 rHDL/(DCA-PEI/p53) 复合物制备成双靶向纳米粒 (图 1),通过 Sigma 和 SR-BI 受体的双重介导,同时递送化疗药二氯乙酸盐 (sodium dichloroacetate, DCA) 和治疗基因 p53 进入肿瘤细胞。该纳米粒粒径均一,表面带中性电荷,对正常细胞毒性小,通过 DCA 和 p53 的协同作用有效阻止肿瘤细胞生长,减少小鼠肿瘤体积至 $(443.23 \pm 78.13) \text{ mm}^3$ 。

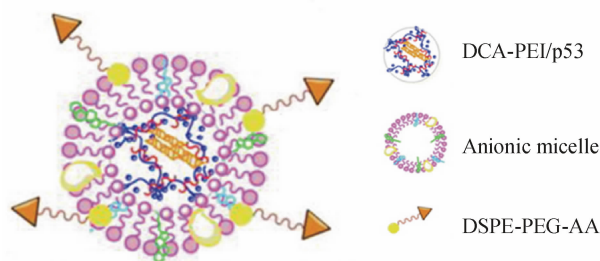


图1 DSPE-PEG-AA/rHDL/DCA-PEI/p53 纳米粒结构图

Zhang 等^[9]用 PEG-DSPE、氢化大豆磷脂及胆固醇按照物质的量的比为 1:22:10 制成脂质膜,随后包载硫酸长春新碱 (vincristine sulphate, VS) 制成纳米制剂,结果显示,该制剂在增加 VS 包封率的同时大幅提高其稳定性,包封率在前 5 个月都保持恒定,第 6 个月才有小幅度的下降,减少了 11.2%。药代动力学实验表明用 PEG-DSPE 包载 VS 后,半衰期显著延长,是上市 VS 制剂的 1.4 倍,AUC 也明显提高了 2.3 倍。Hsu 等^[10]用氢化大豆磷脂、胆固醇与 PEG-DSPE 按照物质的量比 3:2:0.3 制备脂质体,包载抗肿瘤药物阿霉素形成 Nano-X,发现表面修饰的 PEG 层能有效地减少肝 Kupffer 细胞的吞噬作用,阻止 C26 肿瘤细胞的生长,增加荷瘤小鼠的

存活率至 75%，显著改善脂质体的抗肿瘤效果。

1.2 PEG-胆固醇修饰靶向纳米制剂

胆固醇是一种环戊烷多氢菲的衍生物，是动物组织细胞不可缺少的重要物质，参与细胞膜的合成，能够调节电子通道电流。PEG-胆固醇是一种由亲脂性胆固醇共价结合亲水性 PEG 组成的两亲性脂质，能用于形成脂质体复合物以转染细胞和传递药物^[11]。

Zhen 等^[12]用乳化-冻干法将物质的量比为 5:100:10:1 的甘露糖-PEG-胆固醇、十八胺、大豆磷脂酰胆碱和单磷酸脂质 A 制备成脂质体，包封模型抗原牛血清白蛋白(model antigen bovine serum albumin, BSA)形成填充微针阵列。结果显示，该纳米制剂能通过甘露糖介导的吞噬作用将抗原有效递送至免疫细胞，并显著改善免疫反应，因此能作为有效的口服黏膜疫苗佐药传递系统(vaccine adjuvant-delivery system, VADs)。Xu 等^[13]分别将胆固醇琥珀酸单酯与 mPEG-胆固醇衍生物或 mPEG-DSPE 制成囊泡或脂质体，包裹钙黄绿素，之后分别进行药代动力学考察。实验结果表明，mPEG-DSPE 修饰的脂质体的钙黄绿素血浆清除速率显著提升，加速血液清除现象明显；而 mPEG-胆固醇衍生物修饰的脂质体血浆清除速率几乎不变，证明 mPEG-胆固醇衍生物修饰的脂质体能有效减缓或消除加速血液清除现象。

1.3 PEG-脂肪酸修饰靶向纳米制剂

脂肪酸是指一端含有一个羧基的长脂肪族碳氢链，是中性脂肪、磷脂与糖脂的主要成分，可分为饱和与不饱和脂肪酸两大类。PEG-脂肪酸是由 PEG 的羟基与脂肪酸的羧基连接而成，其参与形成的长循环脂质体性质稳定，主要用于递送药物。

Zhang 等^[14]为了改善抗肿瘤药物向肺部肿瘤的传递，用 PEG-硬脂酸盐修饰纳米结构脂质载体(nanostructured lipid carriers, NLCs)。生物分布研究指出，相比于未修饰的 NLCs，PEG-NLCs 延长了血液循环时间，减少了 RES 的吸收，增加了 A549 细胞吸收。Silvander 等^[15]将 PEG 与硬脂酸(stearic acid, SA)或棕榈酸(palmitic acid, PA)分别以醚键或酰胺键连接，形成的衍生物再与加入的二硬脂酰磷脂乙醇胺或二硬脂酰磷脂酰胆碱制成脂质体。实验结果表明，由于长链 PEG 的存在，制成的脂质体具有更好的稳定性，使包裹其中的药物的泄露减

少。Yameaqo 等^[16]将 PEG-脂肪酸酯与癸烷基接枝的环糊精衍生物(CD-C₁₀)通过纳米共沉降法制成 PEG 表面修饰的纳米粒，体外药物释放时间为 96 h，半数致死率为 13 nmol/L，远远优于表面无 PEG 修饰的纳米粒。

2 PEG 化学修饰靶向纳米制剂

PEG 本身只含有 -OH，但可通过化学反应使 PEG 带上不同的反应基团，从而修饰到纳米粒表面。

2.1 PEG-NH₂ 修饰靶向纳米制剂

将 PEG 末端基团化学修饰为 -NH₂，可与 -COOH 通过脱水缩合而将 PEG 化学连接到纳米粒上。Cho 等^[17]先将 mPEG-NH₂ 与透明质酸-神经酰胺(COOH-HACE)通过酰胺键连接，形成 HACE-PEG，自组装制成纳米粒，加载阿霉素。结果显示 HACE-PEG 与 HACE 制成的纳米粒 96 h 后体外释放阿霉素分别为 $(29.17 \pm 3.34)\%$ 和 $(35.17 \pm 1.45)\%$ ，HACE-PEG 制成的纳米粒显著改善了阿霉素的体内药代动力学参数(AUC、MRT、 $t_{1/2}$)。Choi 等^[18]利用 MeO-PEG-NH₂ 与 HA-CA-COOH 通过酰胺键连接，制备 PEG 修饰的 HA-NPs。由于 HA 与肿瘤细胞上多表达的 CD44 受体有很好的亲和力，所以该纳米粒能主动靶向至肿瘤部位，表面修饰的 PEG 层阻止了其与非特异性反应，故 PEG 修饰的 HA-NPs 被证明是有潜力的肿瘤治疗和诊断载体。Chen 等^[19]用长链油酰脂肪酸与 mPEG-NH₂ 反应，并自组装形成胶束，最终制备 PEG 包覆的超顺磁性氧化铁纳米粒。纳米粒表面的 PEG 层阻止了纳米粒的沉降，使纳米粒在 pH 3~10 水溶液或 0.3 mol/L NaCl 的盐溶液中高度稳定。Schuster 等^[20]用 MeO-PEG-NH₂ 与 PS-COOH 纳米粒化学键合，制备成 PS-PEG 纳米粒，与传统的 PS-COOH 纳米粒相比，热驱动的 PS-PEG 纳米粒电荷接近中性，减少了黏膜吸附，易于在呼吸黏膜中移动，更好地发挥药效。Bi 等^[21]利用碳二酰亚胺交联反应将 Mal-PEG-NH₂ 连接到 PLGA-COOH 上，形成 Mal-PEG-PLGA 偶联物，再连接上 Cys-T7，通过溶剂挥发法制成胶束包载卡莫司汀(bis-chloroethyltrosourea, BCNU)，形成 T7-PEG-PLGA/BCNU。由于 T7 与转铁蛋白受体(T_r)有很好的亲和力，且 PEG 能延长血液循环时间，该胶束

能穿透血-脑脊液屏障,用于治疗神经胶质瘤。Zhou 等^[22]采用透析法制备以 PEG 为亲水段,油酸(oleic acid, OA)为亲脂端,赖氨酸(lysine, Lys)为连接段的 mPEG-Lys-OA₂(PLO)修饰的超顺磁性氧化铁纳米粒。由于 PLO 的长分子链和非特异性抗吸附能力,纳米粒能有效躲避 RES 的吞噬,延长血液循环时间,发挥更好的“隐形”长循环作用。

2.2 PEG-COOH 修饰靶向纳米制剂

Alvarez 等^[23]用 PEG-COOH 与 DSPE 连接而成的 PEG-DSPE 制成胶束,包载两性霉素 B(amphotericin B, AmB),胶束表面刷状 PEG 的屏蔽作用降低了胶束的溶血活性,在任何 AmB 浓度下,溶血性不会超过 10%,减少了 Fungizone®(用脱氧胆酸钠溶解的两性霉素 B, AmB-SD)的聚集,但并没有影响 AmB-SD 的抗真菌效果,可有效地应用于临床抗真菌治疗。Zheng 等^[24]利用 PEG-COOH 制备 PEG-琥珀酰亚胺戊二酸(PEG-succinimidyl glutarate, PEG-SG),再将其与氨磁性介孔二氧化硅纳米粒(amine magnetic mesoporous silica nanoparticles, M-MSN-A)的-NH₂反应,得 PEG 修饰的纳米粒(M-MSN-P),将其作为胞嘧啶-鸟嘌呤(CpG)传递载体。结果显示, M-MSN-P 具有优良的载药能力(是无 PEG 修饰纳米粒的 7 倍)、可忽略不计的细胞毒性,易于内化进入细胞,在胞质释放 CpG;每只小鼠给药 25 μg 时, M-MSN-P 的白细胞介素 IL12 的血浆浓度水平远远大于游离 CpG,每只小鼠给药 50 μg 时,该现象更为明显,表示 M-MSN-P 有很强的体内免疫激活活性。Zhou 等^[25]将 mPEG-COOH 与分枝状的 PEI 通过酰胺键连接,随后用 PEG 修饰的 PEI 合成纳米粒(Au PENPs)。由于低细胞毒性和溶血反应, Au PENPs 能被用于 CT 成像, PEG 修饰大大改善了 AuNPs 的生物相容性,半衰期由 11.2 h 延长至 31.76 h,减少巨噬细胞的吸收,能更广泛的应用于肿瘤 CT 成像。

2.3 PEG-CHO 修饰靶向纳米制剂

PEG 修饰的递药系统能延长其在体内的循环时间,但在到达靶向部位后需要快速释药,实现治疗效果。Shi 等^[26]用 PEG-CHO 与 C60@ Au-HBA 的末端氨基反应,形成腙键连接的 C60@ Au-PEG,包载阿霉素,制得纳米粒。该课题组又制备了不含 pH 敏感腙键的 C60@ Au-PEG *, 实验结果显示,在 pH 7.4 和 pH 5.5 环境下, C60@ Au-PEG * 游离

的 PEG 含量分别为 $(28.4 \pm 2.4)\%$ 和 $(23.4 \pm 4.1)\%$, 而 C60@ Au-PEG 游离的 PEG 含量分别为 $(20.8 \pm 3.4)\%$ 和 $(4.1 \pm 2.2)\%$, 表明 pH 敏感的腙键在肿瘤微环境中能快速断裂,释放药物。Hou 等^[27]将 PEG-OH 氧化成 CHO-PEG-CHO, 将其化学修饰到聚多巴胺包覆的 Fe₃O₄ 纳米粒(PDA-coated Fe₃O₄ NPs)上。PEG 链延伸至溶液中,特定条件下形成刷状结构,改善了磁性纳米粒的疏水性和刚性。PEG 充当酶与支持物之间的联系,使 PDA 磁性材料能更好地用于酶固定化。

2.4 PEG-SH 修饰靶向纳米制剂

尽管高柔韧性和高度水化的 PEG 长链能稳定 PEG 修饰的纳米制剂,阻止其与生物大分子的非特异性的反应,但在细胞内吞过程中,PEG 修饰的纳米制剂由于保护层的空间位阻效应而影响肿瘤细胞表面受体对纳米制剂的识别,从而降低纳米制剂的内吞效率。为了解决这一问题,研究提出可分离 PEG 系统的方案,即 PEG 与聚阳离子之间通过可断裂键连接形成嵌段共聚物,如还原敏感的二硫键、pH 敏感腙键等。Suma 等^[28]用 PEG-SH 首先与 2-氨基乙烷硫醇反应生成 PEG-SS-NH₂, 经过一系列反应,最终生成 PEG-SS-PAsp,包载 siRNA,制成多层组装复合物(SMA)。实验指出,在内涵体内由 SMA 递送的 SiRNA 含量远比非二硫键连接 PEG 制得的复合物低($P < 0.01$),表明在 PEG 从纳米制剂分离后, SMA 能更好地进行内涵体逃逸,在不同肿瘤细胞的基因沉默效果显著提升。金纳米粒(AuNRs)是一种有潜力的生物成像和生物传感器^[29],常用十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)在液体介质中支持金纳米粒,但 CTAB 荷正电,对细胞和组织有毒,所以包覆 CTAB 的金纳米粒不能应用于生物学。Qian 等^[30]用 PEG-SH 和二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTTT)取代包覆金纳米粒的 CTAB,形成 PEG 和染料包覆的金纳米棒(PEG-DTTT-GNRs),由于其对组织、器官和神经没有毒性,最大剂量为 8 μg/mL 时的细胞存活率仍高达 86%,可将其应用于体内哨位淋巴结(sentinel lymph node, SLN)成像和肿瘤靶向和诊断,并为实现高效率、无毒的光学成像方法开辟了新的道路。

2.5 PEG-NHS 修饰靶向纳米制剂

活性酯能够与-OH、-NH₂等发生醇交换或酯

交换,从而将两个化合物连接起来。PEG-NHS 是由 PEG-COOH 与 *N*-羟基琥珀酰亚胺发生酯化反应得到。Zhou 等^[31]将甲氧基聚乙二醇琥珀酰亚胺羧甲基酯(methoxy PEG succinimidyl carboxy-methyl ester, SC-NHS-PEG)与 β -葡萄糖苷酶磁性氧化铁纳米粒(β -glucosidase-immobilized magnetic iron oxide-nanoparticles, β -Glu-MNP)连接,形成 PEG 修饰的纳米粒(PEG- β -Glu-MNPs)。实验结果显示,给药 1 h 后, β -Glu-MNP 体内清除了 80%,而 PEG- β -Glu-MNPs 在给药 2 h 后仍存在 20%。由于血液循环时间更长,PEG- β -Glu-MNP 在肿瘤中显示了更高的 β -葡萄糖苷酶活性。Kaminskas 等^[32]将 PEG-NHS 与外层含有 L-lysine 或赖氨酸的对称类似物的树枝状大分子连接,制成了 PEG 修饰的聚赖氨酸树枝状大分子,包载阿霉素,该制剂具有 pH 敏感释放阿霉素,血液循环时间长且肿瘤靶向的特质。

2.6 PEG-OH 修饰靶向纳米制剂

Wang 等^[33]用 mPEG 的-OH 与 DSPE 的-COOH 连接制成的 mPEG-PEG 包裹一种具有聚集增强荧光特性的荧光染料((*Z*)-2,3-bis(4-(*N*-(4-(diphenylamino) styryl) phenyl) acrylonitrile, StCN),形成含有 StCN@PEG 的光学澄清悬液。PEG 的存在使 StCN@PEG 纳米制剂在不同溶液环境中都能保证其稳定性,由于该纳米制剂粒径小、分散性好、化学结构稳定、具备荧光成像能力,故能作为纳米探针应用于体内肿瘤靶向和诊断。Feng 等^[34]用 PEG 的羟基通过酯键两端连接 PLA,合成 HO-PLA-PEG-PLA-OH,再连接焦脱镁叶绿素 A (pyropheophorbide a, PPa)和 F3 肽,制备的纳米粒共传递光敏剂 PPa 和化疗药紫杉醇,最终制得纳米粒 PP NP。在该纳米粒中两种药物包封率高[分别为 $(71.07 \pm 2.57)\%$, $(67 \pm 3.05)\%$],主动靶向至肿瘤,实现化疗与光动力学治疗的协同作用。

3 PEG 参数对靶向纳米制剂性质的影响

由于 PEG 的亲水性、不荷电、且易于修饰到纳米粒表面,大部分研究都把 PEG 修饰的纳米粒做为长循环纳米粒的最佳选择。但是,PEG 排斥蛋白质以及巨噬细胞的能力取决于不同的 PEG 参数,比如相对分子质量、密度、空间构象、柔韧性等。

3.1 PEG 相对分子质量的影响

PEG 相对分子质量越小,链的长度越短,通过增

加靶向纳米制剂与体内受体的接触,从而改善纳米粒的靶向性。Vijayaraghavan 等^[35]指出,PEG 相对分子质量与 PEG 黏度之间存在直接的关系,随着 PEG 相对分子质量的增加,液态 PEG 的黏度增加,PEG₆₀₀₀ 的黏度是 PEG₄₀₀₀ 黏度的 2 倍。Razzazan 等^[36]设计以单壁碳纳米管(single walled carbon nanotube, SWCNTs)作为药物递送载体荷载吉西他滨,表面连接 PEG,得到高载药量的纳米制剂,实验研究了 PEG 相对分子质量对载药量、药物释放和细胞毒性的影响,结果显示,PEG 相对分子质量与载药量呈相关性,但不影响药物释放,而 PEG 相对分子质量越小,该载药系统对 A549 细胞的毒性越大,因此控制 PEG 的相对分子质量对优化载药系统极其重要。以前的研究指出,当乳胶聚苯乙烯与 PEG 连接时,只有低分子量的 PEG 能制备膜渗透纳米粒,而 PEG₁₀₀₀₀ 不能赋予纳米粒膜渗透性^[37];但 Xu 等^[38]的实验结果显示用 PLGA-PEG₁₀₀₀₀ 制成的纳米粒与 PLGA-PEG₂₀₀₀ 和 PLGA-PEG₅₀₀₀ 制成的纳米粒相比具有相似的扩散性。

3.2 PEG 密度的影响

为了实现更好的保护,PEG 需要覆盖整个纳米制剂的表面。密度太小,纳米制剂易于被 RES 消除,血液循环时间减少;密度太大,PEG 链间斥力太大,因此许多研究者认为 PEG 修饰密度比其相对分子质量更为重要,高密度 PEG 链可以弥补低分子量 PEG 带来的影响。PEG 修饰的密度通常是按照表面修饰的 PEG 构象来进行表征的,这个取决于 PEG 链的弗洛里半径(R_f ,即柔性链高分子由于链段的空间干扰而伸展后的构象半径)、PEG 之间的距离以及 PEG 层的长度/厚度。纳米粒在细胞外基质(extracellular matrix, ECM)内的转运能显著影响纳米粒的治疗效果,Tomasetti 等^[39]用荧光对纳米粒的转移效率进行了系统的调查,检验 PEG 相对分子质量和密度对其在 ECM 中流动性的影响。用相同相对分子质量的 PEG 修饰纳米制剂,当修饰密度低于每平方纳米修饰 2 个 PEG 时,纳米粒不能在 ECM 中进行转运;而当修饰密度达到每平方纳米修饰 8 个 PEG 时,纳米粒在 ECM 中具有流动性,能有效转运至病灶部位。Perry 等^[40]和 Walkey 等^[41]指出随着表面 PEG 修饰密度的增加,每个纳米粒上非特异性吸附的蛋白质数量显著减少,PEG 修饰密度和纳米粒粒径都能影响巨噬

细胞吞噬纳米粒的机制和数量,在一定程度上阻止血浆蛋白的调理作用,但并不能完全消除。Li 等^[42]用 mPEG-DSPE 与 1,2-二油酰基-3-三甲氨基丙烷〔(2,3-dioleoyloxy-propyl)-trimethylammonium, DOTAP〕、1,2-二油酰-*sn*-甘油-3-磷脂酰乙醇胺(dioleoyl phosphoethanolamine, DOPE)等制备阳离子脂质体作为载体传递 siRNA。实验结果表明,PEG 的加入使脂质体与细胞表面的不饱和型结合转变为可饱和型,采用共聚焦显微镜定性观察 siRNA 的阳离子脂质体在 6 h 的细胞分布情况,结果显示摩尔分数为 40% 的 DOTAP 与 0%~2% 的 PEG 组合可有效地将 siRNA 转运至细胞质,而 40% DOTAP 与 5% PEG 组合对转运无效。由于 PEG 显中性,所以 PEG 修饰的密度也能决定纳米制剂的电荷,密度越大,整体纳米制剂的电荷越接近中性。

在体内重复注射 PEG 修饰的纳米制剂会导致纳米制剂半衰期缩短,从而减少纳米制剂的被动靶向性,这种现象叫做加速血液消除(accelerated blood clearance, ABC)现象^[43]。这主要是由于 PEG 修饰的纳米制剂的多次重复注射诱导产生了 PEG 特异性的 IgM 抗体〔poly(ethylene glycol)(PEG)-specific IgM antibodies, anti-PEG IgMs〕^[44]。研究指出含 5% mPEG₂₀₀₀-DSPE 的脂质体在低脂质剂量下产生显著的 ABC 现象,而在低 PEG 表面密度(<5%)或极高 PEG 表面密度(>5%)情况下,ABC 现象相对减缓^[44]。Li 等^[45]也发现,尽管第一次给药后的 anti-PEG IgMs 水平相似,9% PEG-lipid 修饰的脂质体诱导产生的 ABC 现象比 3% PEG-lipid 修饰的脂质体更为严重。

3.3 PEG 空间构象的影响

PEG 链有直链或支链,并且其在纳米制剂表面形成的空间构象也有刷状、饼状或蘑菇状等,不同的

生物材料以刷状结构均匀分布在纳米粒表面能最有效的达到“隐形”效果。Marruecos 等^[46]应用高通量单分子示踪法检验 PEG 刷状构象对纤连蛋白(fibronectin, FN, 主要介导细胞黏着)吸附纳米制剂的影响,结果显示,PEG 刷状构象减少了纤连蛋白吸附纳米制剂的速度,降低了蛋白质对纳米制剂的调理作用,从而延长血液循环时间。Jin 等^[47]的研究中,PEG₁₀₀₀呈薄饼状,其受限的链柔韧性及与细胞内基质的疏水反应导致构象在很大程度上发生变形,同时吸附大量的蛋白质(胎牛血清和溶菌酶);而 PEG₂₀₀₀和 PEG₅₀₀₀分别呈紧密和宽松蘑菇状构象,相对于紧密蘑菇状 PEG₂₀₀₀,宽松蘑菇状的 PEG₅₀₀₀构象更灵活,具有高弹性斥力,能够阻止其与蛋白质的非特异性吸附,从而起到“隐形”效果。

4 结 语

药物纳米载体的发展速度并不如理论上发展的那么快,究其原因在于缺乏对纳米载体表面性质的了解,也在于对组织生物学和纳米载体知识的缺乏。研究中常用的药物纳米载体可能在性质上存在某些缺陷,因此构建满足生物需求的药物纳米载体是非常必要的。

PEG 是一种亲水性的高分子聚合物,将其修饰到纳米制剂上能弱化或消除血浆蛋白的调理作用,减少 RES 对纳米制剂的吞噬,从而达到延长血液循环时间的作用,因此对于一些半衰期短的药物或荧光染料,PEG 修饰的纳米制剂能将其包裹在其中,延长其作用时间,提高药效。

但目前将 PEG 修饰到纳米制剂表面的方法并不多样且现有技术还存在缺陷,因此需要做出更大的努力改善 PEG 修饰技术,将 PEG 修饰方法与分析方法结合用于确认修饰结果。表 1 对本文提到的 PEG 修饰的物理和化学方法进行了总结。

表 1 PEG 物理和化学修饰靶向纳米制剂的方法

修饰方法	优 点	缺 点	PEG 衍生物	参考文献
物理插入	技术简单方便 PEG 被限制在纳米制剂表面	空间位阻限制覆盖密度	PEG-DSPE	〔8-10〕
		修饰位点的不稳定性	PEG-胆固醇	〔11-12〕
		需额外的纯化措施	PEG-脂肪酸	〔13-14〕
化学连接	PEG 层稳定	空间位阻限制覆盖密度	PEG-NH ₂	〔15-19〕
		需额外的纯化措施	PEG-COOH	〔20-22〕
			PEG-CHO	〔23-24〕
			PEG-SH	〔25-27〕
			PEG-NHS	〔28-29〕
			PEG-OH	〔30-31〕

在大部分研究中多分散的 PEG 链(如 PEG₂₀₀₀ 和 PEG₅₀₀₀ 的混合)能显著改善 PEG 修饰纳米制剂的表面性质,如主动靶向的选择性。在应用物理或化学方法将 PEG 修饰到纳米制剂表面的同时,还需注意 PEG 参数(相对分子质量、密度、空间构象等)对纳米制剂性质的影响以及 PEG 的 ABC 效应导致的纳米制剂体内循环时间减少的现象,优化修饰的 PEG 参数后构建最优的 PEG 修饰靶向纳米制剂,弱化或消除血浆蛋白的调理作用,减缓或消除 PEG 的 ABC 现象,发挥 PEG 的“隐形”和延长血液循环时间的作用。因此,除了探索 PEG 修饰纳米制剂的方法,量化 PEG 参数对纳米制剂的影响也是至关重要的。

参考文献

- [1] Ke X. Advances in targeted drug delivery system [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2012, **43**(1): 9–15.
- [2] Gina S, Oscar T, Suzuki, *et al.* *Gulp1* is associated with the pharmacokinetics of PEGylated liposomal doxorubicin (PLD) in inbred mouse strains [J]. *Nanomedicine*, 2016, **12**(7): 2007–2017.
- [3] Nag M, Gajbhiye V, Kesharwani P, *et al.* Transferrin functionalized chitosan-PEG nanoparticles for targeted delivery of paclitaxel to cancer cells [J]. *Colloids Surf B*, 2016, **148**: 363–370.
- [4] Lisa M, Victoria M, Brian D, *et al.* A comparison of changes to doxorubicin pharmacokinetics, antitumor activity, and toxicity mediated by PEGylated dendrimer and PEGylated liposome drug delivery system [J]. *Nanomedicine*, 2012, **8**(1): 103–111.
- [5] Rabanel JM, Hildgen P, Banquy X. Assessment of PEG on polymeric particles surface, a key step in drug carrier translation [J]. *J Control Release*, 2014, **185**(10): 71–87.
- [6] Blume G, Cerc G. Liposomes for the sustained drug release *in vivo* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1990, **1029**(1): 91–97.
- [7] Klibanov AL, Maruyama K, Torchilin VP, *et al.* Amphipathic polyethylene glycol effectively prolong the circulation time of liposomes [J]. *FEBS Lett*, 1990, **268**(1): 235–237.
- [8] Zhang F, Li M, Su Y, *et al.* A dual-targeting drug co-delivery system for tumor chemo-and gene combined therapy [J]. *Mater Sci Eng C*, 2016, **64**(1): 208–218.
- [9] Zhang J, Chen Y, Li X, *et al.* The influence of different long-circulating materials on the pharmacokinetics of liposomal vincristine sulfate [J]. *Int J Nanomedicine*, 2016, **11**: 4187–4197.
- [10] Hsu WH, Liu SY, Chang YJ, *et al.* The PEGylated liposomal doxorubicin improves the delivery and therapeutic efficiency of 188Re-Liposome by modulating phagocytosis in C26 murine colon carcinoma tumor model [J]. *Nucl Med Biol*, 2014, **41**(9): 765–771.
- [11] Ochi R, Chettimada S, Gupte SA. Poly(ethylene glycol)-cholesterol inhibits L-type Ca^{2+} channel currents and augments voltage-dependent inactivation in A7r5 cells [J]. *PLoS ONE*, 2014, **9**(9): e107049.
- [12] Zhen Y, Wang N, Gao Z, *et al.* Multifunctional liposomes constituting microneedles induced robust systemic and mucosal immunoresponses against the loaded antigens via oral mucosal vaccination [J]. *Vaccine*, 2015, **33**(35): 4330–4340.
- [13] Xu H, Wang K, Deng Y, *et al.* Effects of cleavable PEG-cholesterol derivatives on the accelerated blood clearance of PEGylated liposomes [J]. *Biomaterials*, 2010, **31**(17): 4757–4763.
- [14] Zhang X, Gan Y, Gan L, *et al.* PEGylated nanostructured lipid carriers loaded with 10-hydroxycamptothecin: an efficient carrier with enhanced anti-tumour effects against lung cancer [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2008, **60**(8): 1077–1087.
- [15] Silvaner M, Bergstrand N, Edwards K. Linkage identity is a major factor in determining the effects of PEG-ylated surfactants on permeability of phosphatidylcholine liposomes [J]. *Chem Phys Lipids*, 2003, **126**(1): 77–83.
- [16] Yameoq JB, Geze A, Choinsard L, *et al.* Self-assembled biotransferified cyclodextrins as Artemisinin nanocarriers-I: formulation, lyoavailability and *in vitro* antimalarial activity assessment [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, **80**(3): 508–517.
- [17] Cho HJ, Yoon IS, Yoon HY, *et al.* Polyethylene glycol-conjugated hyaluronic acid-ceramide self-assembled nanoparticles for targeted delivery of doxorubicin [J]. *Biomaterials*, 2012, **33**(4): 1190–1200.
- [18] Choi KY, Min KH, Yoon HY, *et al.* PEGylation of hyaluronic acid nanoparticles improves tumors targetability *in vivo* [J]. *Biomaterials*, 2011, **32**(7): 1880–1889.
- [19] Chen Y, Tao J, Xiong F, *et al.* Synthesis, self-assembly, and characterization of PEG-coated iron oxide nanoparticles as potential MRI contrast agent [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2010, **36**(10): 1235–1244.
- [20] Schuster BS, Suk JS, Woodworth GF, *et al.* Nanoparticle diffusion in respiratory mucus from humans without lung disease [J]. *Biomaterials*, 2013, **34**(13): 3439–3446.
- [21] Bi Y, Liu L, Lu Y, *et al.* T7peptide-functionalized PEG-PLGA micelles loading with carmustine for targeting therapy of glioma [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, **8**(41): 27465–27473.
- [22] Zhou L, Liu J, Xiong F, *et al.* Preparation and *in vitro* evaluation of PEG-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2013, **44**(4): 316–320.
- [23] Alvarez C, Shin DH, Kwon GS. Reformulation of fungizone by PEG-DSPE micelles: deaggregation and detoxification of amphotericin B [J]. *Pharm Res*, 2016, **33**(9): 2098–2106.
- [24] Zheng H, Wen S, Zhang Y, *et al.* Organosilane and polyethylene glycol functionalized magnetic mesoporous silica nanoparticles as carriers for CpG immunotherapy *in vitro* and *in vivo* [J]. *PLoS*

- ONE, 2015, **10**(10): 1–17.
- [25] Zhou B, Zheng L, Peng C, *et al.* Synthesis and characterization of PEGylated l-lysine-entrapped gold nanoparticles for blood pool and tumor CT imaging[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, **6**(19): 17190–17199.
- [26] Shi J, Chen Z, Wang L, *et al.* A tumor-specific cleavable nanosystem of PEG-modified C60 @ Au hybrid aggregates for radio frequency-controlled release, hyperthermia, photodynamic therapy and X-ray imaging[J]. *Acta Biomaterialia*, 2016, **1**(29): 282–297.
- [27] Hou C, Zhu H, Li Y, *et al.* Facile synthesis of oxidic PEG-modified magnetic polydopamine nanospheres for *Candida rugosa* lipase immobilization[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, **99**(3): 1249–1259.
- [28] Suma T, Miyata K, Anraku Y, *et al.* Smart multilayered assembly for biocompatible siRNA delivery featuring dissolvable silica, endosome-disrupting polycation, and detachable PEG[J]. *ACS Nano*, 2012, **6**(8): 6693–6705.
- [29] Huang X, Sayed IH, Sayed MA, *et al.* Applications of gold nanorods for cancer imaging and photothermal therapy[J]. *Cancer Nanotechnol*, 2010, **624**: 343–357.
- [30] Qian J, Jiang L, Cai F, *et al.* Fluorescence-surface enhanced Raman scattering co-functionalized gold nanorods as near-infrared probes for purely optical *in vivo* imaging[J]. *Biomaterials*, 2011, **32**(6): 1601–1610.
- [31] Zhou J, Zhang J, Gao W. Enhanced and selective delivery of enzyme therapy to 9L-glioma tumor via magnetic targeting of PEG-modified, β -glucosidase-conjugated iron oxide nanoparticles[J]. *Int J Nanomedicine*, 2014, **9**: 2905–2917.
- [32] Kaminskis LM, Kelly BD, Mcleod VM, *et al.* Characterisation and tumour targeting of PEGylated polylysine dendrimers bearing doxorubicin via a pH labile linker[J]. *J Control Release*, 2011, **152**(2): 241–248.
- [33] Wang D, Qian J, He S, *et al.* Aggregation enhanced fluorescence in PEGylated phospholipid nanomicelles for *in vivo* imaging[J]. *Biomaterials*, 2011, **32**(25): 5880–5888.
- [34] Feng X, Jiang D, Kang T, *et al.* Tumor-homing and penetrating peptide-functionalized photosensitizer-conjugated PEG-PLA nanoparticles for chemo-photodynamic combination therapy of drug-resistant cancer[J]. *ACS*, 2016, **8**(28): 17817–17832.
- [35] Vijayaraghavan M, Stolnik S, Howdle SM, *et al.* Suitability of polymer materials for production of pulmonary microparticles using a PGSS supercritical fluid technique; preparation of microparticles using PEG, fatty acids and physical or chemical blends of PEG and fatty acids[J]. *Int J Pharm*, 2013, **441**(1/2): 580–588.
- [36] Razzazan A, Atiyabi F, Kazami B, *et al.* Influence of PEG molecular weight on drug delivery of gemcitabine conjugated to SWCNT-PEG[J]. *Curr Drug Deliv*, 2016, **13**(8): 1313–1324.
- [37] Wang YY, Lai SK, Suk JS, *et al.* Addressing the PEG mucoadhesivity paradox to engineer nanoparticles that “slip” through the human mucus barrier[J]. *Angew Chem*, 2008, **47**(50): 9726–9729.
- [38] Xu Q, Boylan NJ, Cai S, *et al.* Scalable method to produce biodegradable nanoparticles that rapidly penetrate human mucus[J]. *J Control Release*, 2013, **170**(2): 279–286.
- [39] Tomasetti L, Liebl R, Wastl DS, *et al.* Influence of PEGylation on nanoparticle mobility in different models of the extracellular matrix[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, **108**: 145–155.
- [40] Perry JL, Reuter KG, Kai MP, *et al.* PEGylated PRINT nanoparticles: the impact of PEG density on protein binding macrophage association, biodistribution, and pharmacokinetics[J]. *Nano Lett*, 2012, **12**(10): 5304–5310.
- [41] Walkey CD, Olsen JB, Guo H, *et al.* Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake[J]. *J Am Chem Soc*, 2012, **134**(4): 2139–2147.
- [42] Li Y, Zong L, Zhu J. Formulation optimization of PEGylated cationic liposomes as siRNA delivery system[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2011, **42**(5): 412–417.
- [43] Mima Y, Hashimoto Y, Shimizu T, *et al.* Anti-PEG IgM is a major contributor to the accelerated blood clearance of polyethylene glycol-conjugated protein[J]. *Mol Pharm*, 2015, **12**(7): 2429–2435.
- [44] Abu Lila AS, Kiwasa H, Ishida T. The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: clinical challenge and approaches to manage[J]. *J Control Release*, 2013, **172**(1): 38–47.
- [45] Li C, Cao J, Wang Y, *et al.* Accelerated blood clearance of pegylated liposomal topotecan; influence of polyethylene glycol grafting density and animal species[J]. *J Pharm Sci*, 2012, **101**(10): 3864–3876.
- [46] Marruecos FD, Kastantin M, Schwartz DK, *et al.* Dense poly(ethylene glycol) brushes reduce adsorption and stabilize the unfolded conformation of fibronectin[J]. *Biomacromolecules*, 2016, **17**(3): 1017–1025.
- [47] Jin J, Han Y, Zhang C, *et al.* Effect of grafted PEG chain conformation on albumin and lysozyme adsorption: a combined study using QCMD and DPI[J]. *Colloids Surf B*, 2015, **136**(1): 838–844.